DOI:10.11931/guihaia.gxzw201810005

金铁锁转录因子 *ptMYC2* 的克隆和生物信息学分析[1]

孟文俊，张爱丽，蒋乐晓，朱文杰，段 丽，钱子刚*

（云南中医学院/中药材优良种苗繁育工程中心，云南 昆明 650500）

摘 要：金铁锁是 “云南白药”等多种中成药的重要组成，其有效成分为三萜皂苷。*MYC* 类转录因子在调节植物三萜类次生代谢积累有重要作用。该文基于金铁锁转录组测序数据，克隆得到 *ptMYC2* 转录因子的两个全长基因；通过生物信息学软件对两条转录因子的同源性、理化性质、疏水性、跨膜结构、亚细胞定位、结构域、靶基因结合位点等进行初步预测分析。实验结果表明：两条转录因子所编码的蛋白属于亲水性蛋白，不存在跨膜区域，均是非分泌蛋白质，并且不存在信号肽；两条转录因子的亚细胞定位于细胞核；结构域分析显示两个基因都含有 bHLH 家族结构域；预测得到金铁锁三萜皂苷合成途径中 *HMGR*、*FPS*、*SE*、*FPS* 等基因的启动子可能存在与 *MYC2* 结合的 E-box 特异性结合位点。该实验将为进一步研究 *ptMYC2* 基因在金铁锁三萜皂苷合成代谢途径的调控机制奠定基础。

关键词：金铁锁，转录因子，*MYC2*，三萜皂苷，生物合成途径，生物信息学分析

中图分类号：Q943 **文献标识码**：A

Cloning and Bioinformatics analysis of *Psammosilene tunicoides* transcription factor *ptMYC2*

MENG Wenjun, ZHANG Aili, JIANG Lexiao, ZHU Wenjie, DUAN Li , QIAN Zigang*

(*Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, Kunming 650500, China)

Abstract: *Psammosilene tunicoides* is an important com- ponent of various Chinese patent medicines such as “Yunnan Baiyao”，and its active ingredient is triterpenoid saponin. MYC2 is an important transcription factor, which play an important role in regulating the secondary metabolic accumulation of triterpenoids in plants.In this study, we cloned two transcription factors (*ptMYC2-1 and ptMYC2-2*) of *Psammosilene tunicoides* based on Transcriptome sequencing.

基金项目：云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础联合专项（2017FF117-001）；云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础联合专项（2017FF117-030）；云南省应用基础青年项目（2015FD036）[Supported byYunnan Provincial Department of Science and Technology-Yunnan University of Traditional Chinese Medicine Applied Foundation Joint Special Project（2017FF117-001）; Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Yunnan University of Traditional Chinese Medicine Applied Foundation Joint Special Project（2017FF117-030）;Yunnan Applied Basic Youth Project（2015FD036）]。

作者简介：孟文俊(1992-)，女，云南曲靖人，硕士研究生，主要从事中药资源开发与利用工作，(E-mail) 1909242258@qq.com。

* **通信作者**：钱子刚，博士，教授，主要从事中药资源开发与分子生物学研究，（E-mail) qianzig@aliyun.com。

Meanwhile，the homology ，physical and chemical parameters，hydrophobicity ，transmembrane helices ， subcellular location， domain ， target gene binding site were predicted through bioinformatics software. The experimental results showed that the proteins encoded by the two transcription factors belonged to the hydrophilic protein and do not exist the transmembrane region, both of them were non-secreted proteins, and without signal peptide. The subcellular of two transcription factors localizes to the nucleus. Domain analysis revealed that both genes contain the bHLH family domain. We predicted that the promoter of these genes (*HMGR*，*FPS*，*SE* and *FPS*), which involved the triterpenoid saponin synthesis pathway of *Psammosilene tunicoides*, contained the E-box binding domain. This study provided the basis for studying the regulatory mechanisms of the *ptMYC2* gene in the metabolic pathway of triterpenoid saponins.

Key words: *Psammosilene tunicoides*, transcription factor, *MYC2*, triterpenoid saponin, biosynthetic pathway, bioinformatics analysis

金铁锁（*Psammosilene tunicoides*）是云南道地的濒危药用植物，是“云南白药”等多种中成药的重要组成。其活性成分是齐墩果烷型三萜皂甙，具有显著的镇痛和抗炎等药理活性（Zhang et al，2012）。由于其显著的药理活性，该药药用资源已开始匮乏。因此，揭示相关转录因子在金铁锁三萜皂苷合成途径的调控机制，定向增加金铁锁三萜皂苷的积累，显得尤为重要。

茉莉酸（JAs）是植物中重要的植物激素（包括 JA 及其甲酯衍生物 MeJA），它是植物响应生物或非生物胁迫的重要信号转导分子（Devoto &Turner，2010）。其通过在次生代谢过程中调节相关酶基因，可以合成次生代谢产物，如类黄酮和萜类化合物，从而提高植物的抗逆性。其中 *MYC2* 转录因子是茉莉酸（JAs）信号途径中的重要转录因子，其可以通过和靶基因的启动子结合，调节下游基因的表达（Nims et al，2009）。当植物处于正常状态下，植物体内的核蛋白 JAZ（Jasmonate-ZIM Domain）及一些共同抑制物（如 TOPLESS 或 TPL-related proteins TPLs）能够抑制 JA 信号途径中的转录因子，使其不能正常和靶基因的启动子结合，从而抑制转录因子激活下游基因的表达（Chini et al，2007）。相反，当植物受到胁迫时，JA 可以与异亮氨酸共轭以形成茉莉酸异亮氨酸共轭物 JA-Ile。 JA- Ile 具有一定的生物活性，能使 JAZ 蛋白与 Skp1/ Cullin1/ F- box protein COI1（ SCF COI1）形成共轭复合体，该复合物被 26 S 蛋白酶降解，其释放转录因子并调节下游应激基因的表达。促进次生代谢产物的积累（Thines et al，2007）。目前，已有一些关于 *MYC2* 转录因子调节植物次生代谢产物合成的研究报道，如烟草中尼古丁的合成需要 *NtMYC2* 的参与，*NtMYC2a* 和 *NtMYC2b* 可与抑制因子 *NtJAZ1* 形成核配合物，并调节茉莉酸诱导的尼古丁生物合成的多个步骤（Zhang et al，2012）。 Hong et al (2012)发现 *MYC2* 通过直接结合到倍半萜合酶 *TPS21* 和 *TPS11* 的启动子区激活表达，调节萜类合酶基因表达和挥发性倍半萜的合成。在长春花

中，*CrMYC2* 作为早期茉莉酸甲酯响应因子，通过调节 *ORCA* 基因表达进而调控一系列吲哚类生物碱 (TIAs) 合成酶基因的表达（Zhang et al，2011）。但是对金铁锁转录因子的研究尚未见有报道。目前课题组前期已经克隆了金铁锁齐墩果烷型三萜皂苷生物合成途径中多个关键酶基因，但对这些基因的对转录调控的机制尚不清楚。鉴于此，本研究克隆了金铁锁中相关的 *ptMYC2* 基因，并进行了生物信息学分析，预测可能与克隆的 *ptMYC2* 相互作用的靶基因。为揭示金铁锁三萜皂苷代谢途径的转录因子调控机制奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

金铁锁采集于云南省丽江市，经云南中医学院钱子刚教授鉴定为石竹科金铁锁属植物金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu。

1.2 主要仪器

高速冷冻离心机 (eppendorf)；电泳仪 (BIO—RAD 公司)；DYC —33A 微型电泳槽 (BIO — RAD 公司)；凝胶成像系统 (BIO—RAD 公司)； PCR 反应扩增仪 (BIO—RAD 公司)；移液枪(eppendorf)；常用耗材均购自昆明鼎国生物技术有限公司。

1.3 主要试剂

TaKaRa Minibest Universal RNA Extraction Kit RNA 提取试剂盒（TaKaRa 生产批号：AK1602）；TaKaRa PrimeScript^{TM1}1st cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 生产批号：AK4501)反转录试剂盒；TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extracyion Kit Ver 4.0 割胶回收试剂盒（TaKaRa 生产批号：AK1901）aKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver 4.0 质粒提取试剂盒；DL2000 DNA Marker (TaKaRa 生产批号：A2101A)等。

1.4 方法

1.4.1 引物设计　依据金铁锁转录组中调控因子 *ptMYC2* 的两条基因序列（序列见附录）分别设计一对扩增引物（表 1）

表 1　引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 the primer name	引物序列 primer sequence
ptMYC2-1-F	ATGAATACTTGGTCTTCTACAAA
ptMYC2-1-R	TTAAAGATAAGAAAGTATTTGG

ptMYC2-2-F	ATGAATTTTTGGTCATCTTCTCA
ptMYC2-2-R	TCAGTTTTTCTCCAATTTAGCTT

1.4.2 金铁锁转录因子 *ptMYC2* 的克隆 采用总 RNA 提取试剂盒提取金铁锁根中总 RNA；采用 Takara 的 PrimeScript^{TM}1st cDNA Synthesis Kit 试剂盒将总 RNA 反转得到第一链 cDNA，以该 cDNA 为模板，利用设计的引物进行两条 *ptMYC2* 的全长扩增。其中 PCR 体系如表 2 和表 3。

表 2 *ptMYC2-1* PCR 反应体系

Table 2 *ptMYC2-1* PCR reaction system

试剂 Components	使用量 Volume(μL)
cDNA	2
ptMYC2-1-F	1
ptMYC2-1-R	1
ddH$_2$O	8.5
Primer max permix	12.5
total	25

表 3 *ptMYC2-2* PCR 反应体系

Table 3 *ptMYC2-2* PCR reaction system

试剂 Components	使用量 Volume(μL)
cDNA	2
ptMYC2-2-F	1
ptMYC2-2-R	1
ddH$_2$O	8.5
Primer max permix	12.5
total	25

经过多次筛选，确定的 *ptMYC2-1* 的体系：98 ℃、1 min，98 ℃、10 s，48 ℃、15 s，72 ℃、45 s 共 32 个循环；72 ℃ 10 min，4 ℃终止。*ptMYC2-2* 的体系：98 ℃、 1 min，98 ℃、

10 s，55 ℃、15 s，72 ℃、45 s 共 32 个循环；72 ℃ 10 min，4℃终止。PCR 产物用 1. 0%琼脂糖凝胶电泳后，使用试剂盒（TaKaRa）割胶回收并纯化，经过测序得到序列信息。

1.4.3 金铁锁转录因子 *ptMYC2* 的 T 克隆载体构建 将纯化后的产物与 1 μL PMD^{TM} 18 -T vector cloning Kit 构建 10 μL 连接体系，连接后转化至酵母感受态细胞中，涂布于 LB 固体培养基（氨苄青霉素抗性）上，37 ℃温育培养，后挑单克隆过夜培养，使用质粒提取试剂盒按说明提取质粒，进行 PCR 验证后进行测序。

1.4.4 金铁锁转录因子 *ptMYC2* 的生物信息学分析 对金铁锁的转录调控因子 *ptMYC2* 的两个基因进行生物信息学分析。在 NCBI(https: //www.ncbi.nlm.nih.gov/) 网站上通过 BLAST 程序进行序列同源性比对；使用 ORF Finder（https: //www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/ ）寻找其开放阅读框；通过 ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白质的理化性质。用 ProtScale(https: //web.expasy.org/protscale/) 软件进行疏水性分析；在 TMHMM(http: //www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)网站预测蛋白的跨膜区域；运用在线工具 SignalP3.0（http： //www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/)服务器进行蛋白质信号肽预测分析；通过 TargetP 1.1 Server(http: //www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) 和 Cell-PLoc 2． 0(http: //www． csbio． sjtu． edu． cn/bioinf/Cell-PLoc-2/) 预测蛋白质的亚细胞定位情况；使用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）软件对 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 的保守结构域进行预测;应用在线软件 CFSSP（http: //www.biogem.org/tool/chou-fasman/index.php）对蛋白质的二级结构进行预测。通过 SWISS－MODEL（https: //swissmodel.expasy.org/interactive）进行三级结构预测；应用 MEGA 5. 0 软件构建系统进化树；在 NCBI 中使用 Blast 来搜索目标基因的相似性，参照最高相似物种的序列搜索该序列的基因组序列，并下载目标基因上游 2 000 bp 的区域作为该目标基因的启动子序列，采用 JASPAR2016 server 预测可能与 *ptMYC2* 互作的靶基因及结合信息位点。

2 结果与分析

2.1 金铁锁转录因子 *ptMYC2* 的克隆

提取金铁锁根的总 RNA 进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，得到的 RNA 条带清晰，表明提出金铁锁 RNA。将 RNA 反转为 cDNA，PCR 扩增后经过 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测并测序验证。将全长构建入 T 克隆载体，测序后结果表明扩增序列与转录组序列基本一致。

2.2 金铁锁转录因子基因的生物信息学分析

2.2.1 金铁锁转录因子基因同源性分析 通过 NCBI Blast 进行同源性分析，由结果可知，两

个转录因子 *ptMYC2* 与其它植物的 *MYC2* 转录因子具有同源性，根据结果推测扩增出金铁锁 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 基因。

2.2.2 金铁锁转录因子基因编码蛋白质理化性质分析 *ptMYC2-1* 转录因子的蛋白理化性质由 Protparam 在线工具预测后，分析结果显示：*ptMYC2-1* 转录因子开放阅读框 1 713 bp，编码了 570 个氨基酸；预测分子式为 $C_{2779}H_{4407}N_{787}O_{885}S_{23}$；分子量为 6 374.68；理论等电点为 6.06；在组成的氨基酸当中，丝氨酸（Ser）占比达 11.4%，相对较高；不稳定参数为 47.66，推测 *ptMYC2-1* 蛋白为不稳定蛋白。 脂肪族指数为 76.91。使用相同的方法来预测 *ptMYC2-2* 转录因子的理化性质，*ptMYC2-2* 的开放阅读框长度为 1 902 bp，转录因子编码 663 个氨基酸；推测蛋白质分子式为 $C_{3018}H_{4763}N_{863}O_{972}S_{20}$；分子量为 69 330.42；理论等电点为 5.33；在组成的氨基酸当中，也是丝氨酸（Ser）占比最高，达到 10.6%；不稳定参数为 52.4，推测 *ptMYC2-2* 的蛋白为不稳定的蛋白；脂肪指数为 70.88。

2.2.3 金铁锁转录因子基因编码蛋白质的疏水性分析 采用 ProtScale 对金铁锁转录因子 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 的氨基酸序列的疏水性/亲水性进行分析，从结果可知（图 1 和图 2），大约再 379 bp 左右位置 *ptMYC2-1* 蛋白有一个典型的亲水性区域；大约再 89 bp 左右位置 *ptMYC2-2* 蛋白有一个典型的亲水性区域。

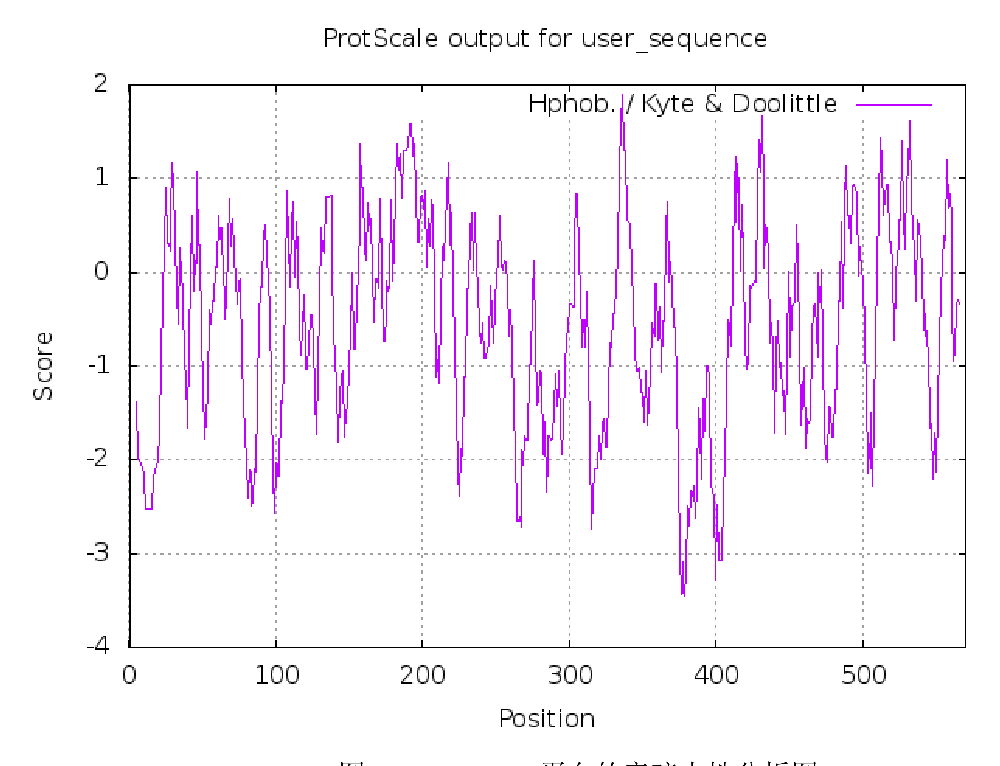


图 1　*ptMYC2-1* 蛋白的亲疏水性分析图

Fig. 1 Hydrophobicity analysis of *ptMYC2-1* protein

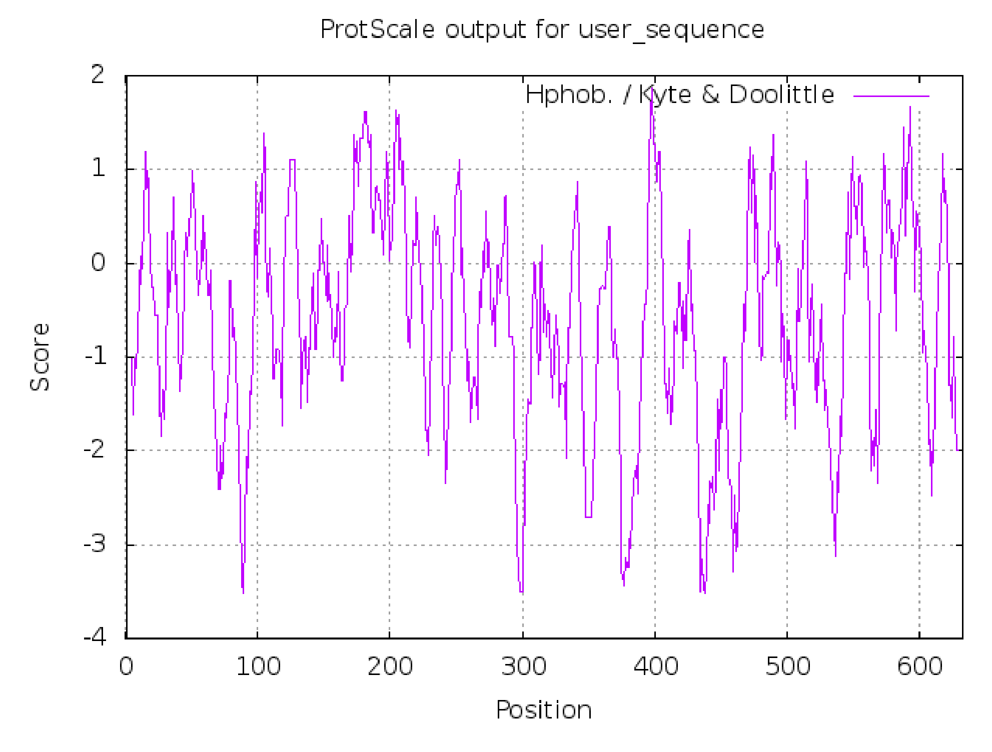


图 2　*ptMYC2-2* 蛋白的亲疏水性分析图

Fig. 2 Hydrophobicity analysis of ptMYC2-2 protein

2.2.4 金铁锁转录因子基因编码蛋白质的跨膜区分析 通过 TMHMM2.0 对两个转录因子进行蛋白跨膜结构分析，预测结果显示，这两个基因编码的蛋白均不存在跨膜区域，都不属于跨膜蛋白。

2.2.5 金铁锁转录因子基因编码蛋白质的信号肽、亚细胞定位预测分析 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 使用 SignalP 3. 0 软件进行信号肽预测，从神经网络模型分析，可以判断两种蛋白质都没有信号肽。隐马尔福模型进一步证实，金铁锁 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 编码的蛋白质均是非分泌蛋白质，并且不存在信号肽。由在线细胞定位分析工具 TargetP1.1 服务器分析 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 编码的蛋白的定位情况，结果显示都定位在其他细胞器，再由 Cell-PLoc 2．0 进行具体定位分析，两个因子均定位在细胞核。

2.2.6 金铁锁转录因子基因结构域分析 使用 SMART 软件对 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 的保守结构域进行预测，结果得知，*ptMYC2-1* 从 39 到 218 位置之间存在一个高度保守的结构功能域 bHLH(图 3)。*ptMYC2-2* 从 28 到 208 位置之间存在一个高度保守的结构功能域 bHLH（图 4）。即 bHLH 家族成员共有的典型结构域。

bHLH-MYC_N domain

This is a Pfam domain. Please see the **bHLH-MYC_N** entry in Pfam for full annotation.

Position:	**39** to **218**
E-value:	**2.3e-48** (HMMER3)

Pfam bHLH-MYC_N

图 3 *ptMYC2-1* 结构域预测

Fig. 3 *ptMYC2-1* domain prediction

bHLH-MYC_N domain

This is a Pfam domain. Please see the **bHLH-MYC_N** entry in Pfam for full annotation.

Position:	**28** to **208**
E-value:	**4.1e-51** (HMMER3)

Pfam bHLH-MYC_N

图 4 *ptMYC2-2* 结构域预测

Fig. 4 *ptMYC2-2* domain prediction

2.2.7 金铁锁转录因子基因编码蛋白质的二级结构及三级结构预测 通过二级结构在线预测软件 CFSSP 对 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 分别进行分析，结果如下图所示，*ptMYC2-1* 编码蛋白二级结构中，α-螺旋（H）占 70%，β 折叠（E）占 57.2%，转角（T）占 14.0%。*ptMYC2-2* 编码蛋白二级结构中，α-螺旋（H）占 65.9%，β 折叠（E）占 51.3%，转角（T）占 14.4%。两个基因编码的蛋白质的二级结构均是混合型。以拟南芥 *AtMYC2* 蛋白（登录号 NM-102998.3）为参比模版，利用 SWISS－MODEL 对 *ptMYC2- 1* 和 *ptMYC2-2* 的蛋白质三维立体结构进行预测。结果如下图所示（图 5、图 6 和图 7），金铁锁 *ptMYC2* 蛋白的 bHLH 区域与拟南芥 *AtMYC2* 蛋白的 bHLH 区域结构结构相似。相同 bHLH 和不同 bHLH 转录因子的 α-螺旋之间可以相互作用，形成同源或异源二聚体从而与靶基因启动子的不同部位结合，发挥转录调控作用。



图 5　*ptMYC2-1* 三级结构预测

Fig. 5 *ptMYC2-1* tertiary structure prediction

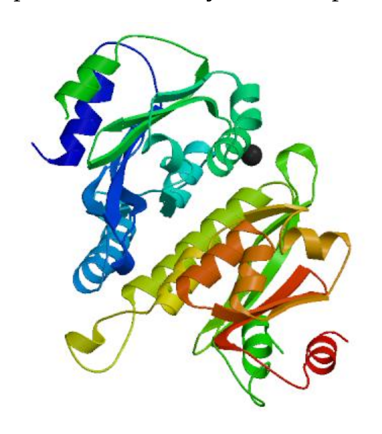


图 6　*ptMYC2-2* 三级结构预测

Fig. 6 *ptMYC2-2* tertiary structure prediction

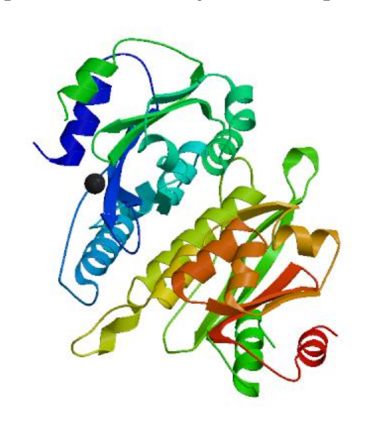


图 7　*AtMYC2-2* 三级结构

Fig. 7 *AtMYC2-2* tertiary structure prediction

2.2.8 金铁锁转录因子基因系统进化树的构建　将金铁锁 *ptMYC2-1* 和 *ptMYC2-2* 与 GenBank 数据库中多种植物的转录因子进行比对分析后，选取相似性高的植物的 *MYC2* 转录因子，利用 MEGA 5. 0 中的 Neighbor-Joining 方法，构建系统进化树。结果表明 *ptMYC2-1* 与藜麦的 *MYC2* 亲缘关系接近（图 8）。*ptMYC2-2* 也与藜麦中的 *MYC2* 亲缘关系接近（图 9）。由于藜麦属于藜科，金铁锁属于石竹科，藜科与石竹科均属于较原始的类群，亲缘关系较近，所以本实验克隆得到的金铁锁 *ptMYC2* 与藜麦的 *cqMYC2* 聚为一类。

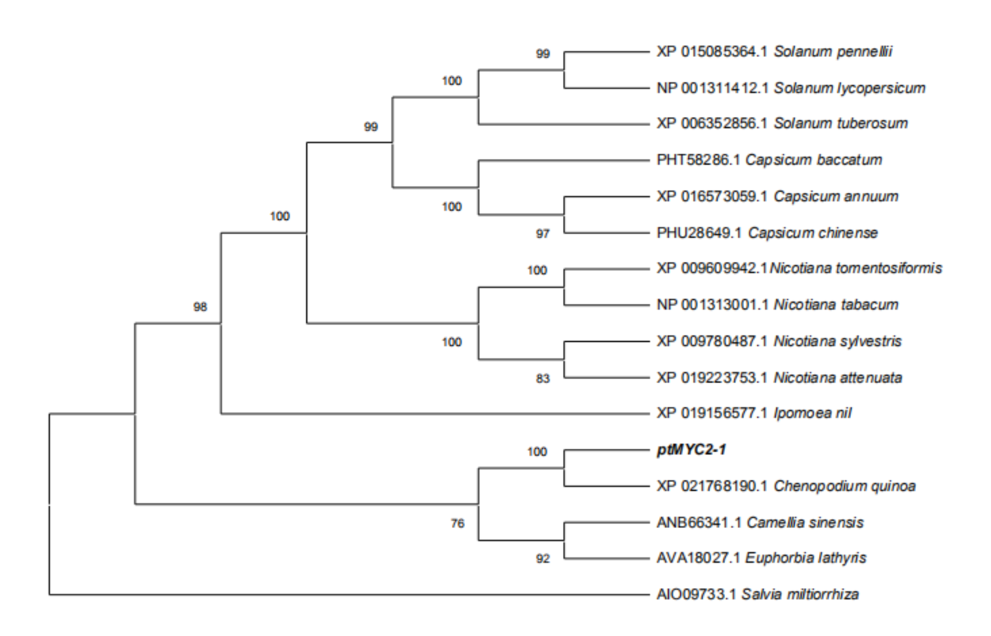


图 8　*ptMYC2-1* 蛋白与其他植物 *MYC2* 蛋白的系统发育分析

Fig. 8 Phylogenetic relationships analysis of *ptMYC2-1* protein of *Psammosilene tunicoides*

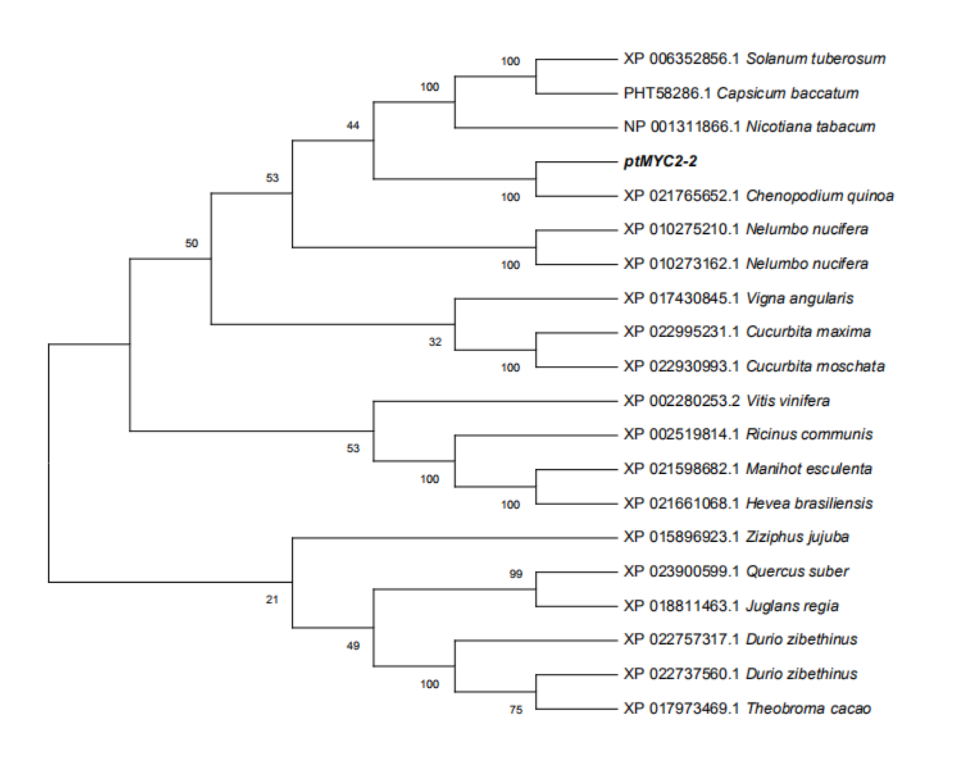


图 9　*ptMYC2-2* 蛋白与其他植物 *MYC2* 蛋白的系统发育分析

Fig. 9 Phylogenetic relationships analysis of *ptMYC2-2* protein of *Psammosilene tunicoides*

2.2.9　转录因子与靶基因结合位点信息分析　*MYC* 类转录因子对目的基因的调控，是通过与目的基因启动子的 E-box 特异性结合域的结合实现的。由于金铁锁还未进行过全基因组测

序，本实验通过 Blast 软件对金铁锁三萜皂苷合成途径上的关键酶基因 *HMGR*、*SE*、*FPS*、*β*-AS 分别进行相似性搜索，其中，金铁锁 *HMGR* 的基因序列与胡杨（*Populus euphratica* ）的相似性最高，*SE1* 与甜菜 （*Beta vulgaris* subsp.）的相似性最高，*SE2*、*FPS*、*β -AS* 的序列与藜麦（*Chenopodium quinoa* ）的相似性最高，分别下载相似性最高物种基因上游 2 000 bp 的区域作为该基因的启动子序列(启动子序列见附录），分析预测可能与 *ptMYC2* 互作的靶基因及结合信息位点。结果如表 4 所示。

表 4　转录因子与靶基因结合位点预测

Table 4 Prediction of binding sites of transcription factors and target genes

转录因子 Transcription factor	靶基因 Target gene	结合位点(正链) Binding site (Positive chain)	起点 starting point	终点 Ending point
ptMYC2	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（*HMGR*） 3 -hydroxy-3 -methylglutaryl CoA-coenzyme A （*HMGR*）	CACATG	1494	1499
ptMYC2	鲨烯环氧酶 (*SE*) Squalene epoxidas	CACATG	1463	1468
ptMYC2	β-香树素合酶（*β*-AS） β-amyrin synthase	CACATG	1747	1752
ptMYC2	法尼基焦磷酸合酶（*FPS*） Farnesyl pyrophasphate synthase	CACGTG	1747	1752

3　讨论

金铁锁是西南地区的珍稀濒危药材，为多种著名中成药的重要组成，其有效成分为五环三萜皂苷。由于其显著的药理活性，金铁锁资源遭到大量的挖掘破坏，已处于濒危状态，目前已被 IUCN 收录为濒危种。*MYC* 类转录因子是植物茉莉酸类激素响应途径中的核心转录因子，近年来，在烟草（Zhang et al，2012）、拟南芥（Hong et al，2012）、长春花（Hedhili et al，2010）、红豆杉（Lenka et al，2015）等植物中克隆得到的 *MYC2* 转录因子，研究发现其都参与调节了次生代谢产物的合成。在发现的众多 *MYCs* 转录因子中，*MYC2* 是研究较多的一类转录因子。鉴于此，本实验开展对金铁锁转录因子 *ptMYC2* 的研究，以期能够获得参与金铁锁有效成分调控的 *ptMYC2* 转录因子，为后期完成金铁锁有效成分的定向积累奠定

基础。

实验克隆得到两条具有完整开放阅读框 ORF 的 *ptMYC2* 转录因子，*ptMYC2-1* 与 *ptMYC2-2* 的 ORF 长度分别为 1 713 bp 和 1 902 bp，分别编码 570 个和 633 个氨基酸残基，分子量为 63.75 KD 和 69.33 KD。 通过 SMART 软件分析，*ptMYC2-1* 与 *ptMYC2-2* 都存在一个高度保守的结构功能域 bHLH，具有 bHLH 家族成员共有的典型结构域。三级结构预测图可以看出，实验获得的两条 *ptMYC2* 基因与拟南芥的 *AtMYC2* 有相似的三级结构，都具有 bHLH 家族共有的 α 螺旋 1-环-α 螺旋 2(helix- loop- helix)保守结构域，该 helix- loop- helix 结构可以与靶基因启动子相结合，从而发挥对基因的调控作用（Stevens et al，2010）。同时，实验将该两条序列与其他氨基酸序列进行 BlastX 同源比对发现，本实验克隆得到的两条 *MYC2* 编码的蛋白与烟草（*Nicotiana tabacum*）的 *NtMYC2* 编码蛋白同源性达到 50%以上，烟草中该转录因子主要是参与调控了烟草中尼古丁的生物合成（Zhang et al，2012），故推测该两条 *ptMYC2* 转录因子也可能与金铁锁次生代谢产物的调控有关。

MYC2 转录因子主要是通过与目的基因 DNA 的结合来调控基因的表达。而这些与目的基因的特异性结合区域，一般都存在于目的基因的启动子上（沈乾等，2012）。因此，预测 *MYC2* 启动子与靶基因的特异性结合区域是研究转录因子调控的前提。研究表明 bHLH 蛋白可分为 A，B，C，D，E 和 F，这取决于 bHLH 的基本 DNA 结合模式。B 类 bHLH 可与具有 5′- CACGTG-3′特征的 E- box 结合，其中包括 *MYC* 家族（Ledent &Vervoort，2001）。因此，本实验以 E-box 作为结合片段，选取课题组前期研究三萜皂苷合成途径中的几个关键酶基因作为靶基因，通过 Blast 软件对这些关键酶基因进行相似性搜索，以搜索到的相似性最高的物种为参考，选取参考基因上游 2 000 bp 作为启动子，分析与 *ptMYC2* 靶基因的结合信息位点。预测结果显示，金铁锁三萜皂苷合成途径中的 3- 羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（*HMGR*），鲨烯环氧酶 (*SE*)，法尼基焦磷酸合成酶(*FPS*)，β-香树素合酶（*β-AS*）等基因都有可能启动子中具有 E-box 的特异结合位点，*ptMYC2* 转录因子有可能与这些基因互作从而对其进行调控。沈乾等（沈乾等，2016）在对青蒿 *MYC* 类转录因子的研究中发现，转录因子 *AaMYC2* 能与青蒿素生物合成途径中的 P450 基因 *CYP71AV1* 和 *DBR2* 基因的启动子结合，进而参与调控青蒿素的生物合成过程。本实验通过对 *ptMYC2* 与靶基因结合位点的预测分析，为后续开展的实验提供了丰富的基因资源。

综上所述，本实验克隆得到了两条 *ptMYC2* 转录因子，并对其进行生物信息学分析，为后期即将开展的酵母双杂等验证该两条转录因子功能的实验提供了科学依据。

参考文献：

CHINI A, FONSECA S, FERNANDEZ G, et al, 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling [J]. Nature, 448(7154) : 666-671.

DEVOTO A, TURNER JG, 2010. Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signaling network [J]. Physiol Plant, 123(2): 161-172.

HEDHILI S, MATTEI MVD, COUDERT Y, et al, 2010. Three non-autonomous signals collaborate for nuclear targeting of CrMYC2, a *Catharanthus roseus*, bHLH transcription factor [J]. BMC Res Notes, 3 (1): 301-309.

HONG GJ, XUE XY, MAO YB , et al, 2012. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]．Plant Cell，24(6) ：2635-2648.

LEDENT V, VERVOORT M, 2001. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis [J]. Genome Res, 11 (5): 754-770.

LENKA SK, NIMS NE , VONGPASEUTH K, et al, 2015. Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4 [J]. Front Plant Sci, 6: 115.

NIMS E, VONGPASEUTH K, ROBERTS SC, et al, 2009. WITHDRAWN: TcJAMYC: A bHLH transcription factor that activates paclitaxel biosynthetic pathway genes in yew [J]. J Biol Chem, 290(33) : 1-19.

SHEN Q, LU X, YAN T, et al, 2016. The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. New Phytol, 210 (4): 1269-1281.

SHEN Q, LU X, ZHANG L, et al, 2012. Advances in research on the function of MYC2 transcription factors in plants[J]. J Shanghai Jiaotong Univ(Agric Sci Ed), 30 (6): 51-57. [沈乾，陆续，张凌，等，2012. 植物中 MYC2 转录因子功能研究进展[J]. 上海交通大学学报：农业科学版，30 (6)：51-57.].

STEVENS JD, ROALSON EH, SKINNER MK, 2010. Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation[J]. Differentiation, 76(9): 1006-1022.

THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, et al, 2007. JAZ repressor proteins are targets of the

SCF(COI1) complex during jasmonate signalling [J]. Nature, 448(7154): 661-665.

ZHANG H, HEDHILI S, MONTIEEL G, et al, 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. Plant J, 67(1): 61-71.

ZHANG HB, BOKOWIEC MT, RUSHTON PJ, et al, 2012. Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis [J]. Mol Plant, 5(1): 73-84.

ZHANG J, CAO W, TIAN J, et al, 2012. Evaluation of novel saponins from *Psammosilene tunicoides* and their analogs as immunomodulators [J]. Int Immunopharmacol, 14 (1) : 21-26.